

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2002-286643
(P2002-286643A)

(43)公開日 平成14年10月3日(2002.10.3)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	F 2 G 0 4 3
33/53		33/53	M
33/566		33/566	
37/00	1 0 2	37/00	1 0 2

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願2001-93266(P2001-93266)

(22)出願日 平成13年3月28日(2001.3.28)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 塚田 護

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(74)代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA02 EA01 GA07

GB07 HA01 HA05 JA02 KA09

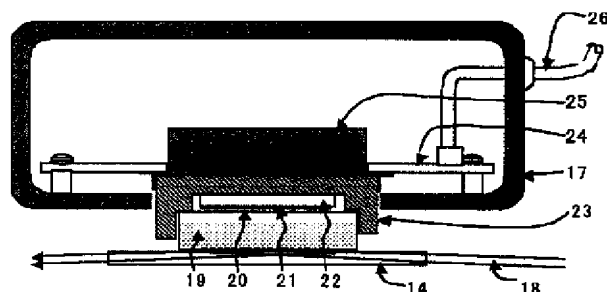
LA03 NA06

(54)【発明の名称】 検査プレートからの発光像の読み取り装置及びそれに用いる光学系

(57)【要約】

【課題】 DNAマイクロアレイなどを用いて作製した検査プレート上を読み取り装置の読み取り部を走査させる必要がなく、検査プレートの被測定面での反応結果を一度に画像として検出できる装置システム、及びそれに用いる光学系を提供すること。

【解決手段】 透明基板上でのプローブ・アレイと試料との反応の有無を発光の有無として検出するための発光像の読み取り装置における読み取り部を構成する光学系にCCDイメージセンサとファイバースペースプレートとを組合せた光学系を用いる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 基体の表面に配置された複数の被測定部からの発光を検出するための装置であって、前記被測定部と密着し、前記被測定部からの発光を受光するための受光面を有し、受光した光を前記受光面の他面側に伝送するファイバーフェースプレートと、前記ファイバーフェースプレートの前記他面側において、前記被測定部から伝送されてきた光を受光し検出するための検出手段とを有する光検出装置。

【請求項2】 前記受光手段は、受光した光の情報を出力する出力手段を備える請求項1に記載の光検出装置。

【請求項3】 前記受光手段は、受光した光の情報を電子データとして出力するCCDイメージセンサである請求項1または2に記載の光検出装置。

【請求項4】 前記被測定部からの発光が、蛍光標識物に励起光を照射することで得られるものであり、前記透明基板の表面に対する裏面側から前記被測定部に入射し、裏面側に反射する角度で該被測定部に励起光を照射するための光学系を更に有する請求項1乃至3のいずれかに記載の光検出装置。

【請求項5】 前記CCDイメージセンサの読み取り面の画素ピッチが、前記被測定部に配列された複数のスポットの配列ピッチに対応している請求項3または4に記載の光検出装置。

【請求項6】 前記被測定部に配置されたスポットからの発光がプローブと該プローブにより特異的に認識される標的物質との結合に基づくものである請求項1～3のいずれかに記載の光検出装置。

【請求項7】 該プローブが一本鎖核酸プローブである請求項5記載の光検出装置。

【請求項8】 該一本鎖核酸プローブが一本鎖DNAプローブを含む請求項6記載の光検出装置。

【請求項9】 該一本鎖核酸プローブがRNAプローブを含む請求項6記載の光検出装置。

【請求項10】 該一本鎖核酸プローブが一本鎖PNAプローブを含む請求項6記載の光検出装置。

【請求項11】 基板の表面に配置された複数の被測定部からの発光を読み取るための装置であって、前記被測定部と密着し、前記被測定部からの発光を受光するための受光面を有し、受光した光を前記受光面の他面側に伝送するファイバーフェースプレートと、前記ファイバーフェースプレートの前記他面側において、前記被測定部から伝送されてきた光を受光し、受光した光の情報を電子データとして出力するためのCCDイメージセンサと前記CCDイメージセンサから出力された電子データを蓄積するメモリとを有することを特徴とする発光読み取り装置。

【請求項12】 前記被測定部からの発光が、蛍光標識物に励起光を照射することで得られるものであり、前記基板の表面に対する裏面側または側面側から前記被測定

部に入射し、裏面側に反射または側面側に透過する角度で該被測定部に励起光を照射するための光学系と該光学系に励起光を供給する励起光発生手段とを更に有する請求項11に記載の読み取り装置。

【請求項13】 前記メモリに蓄積された光量に関する電子データの呼び出し手段と、該呼び出し手段によって呼び出された電子データに基づいて前記発光像を表示する表示手段とを更に有する請求項11または12に記載の読み取り装置。

【請求項14】 前記被測定面に配置されたスポットからの発光がプローブと該プローブにより特異的に認識される標的物質との反応に基づくものである請求項11～13のいずれかに記載の読み取り装置。

【請求項15】 基板の表面に配置された複数の被測定部からの発光を検出するための検出方法であって、前記被測定部からの発光を受光するための受光面を有し、受光した光を前記受光面の他面側に伝送するファイバーフェースプレートを前記被測定部と密着させ、前記ファイバーフェースプレートの前記他面側において、前記被測定部から伝送されてきた光を受光手段により受光し検出すること特徴とする光検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は試料中の標的物質を検出するためのプローブと標的物質との反応や相互作用により得られる検査プレート上で得られる標識からの発光像の読み取り装置及びそれに用いる光学システムに関する。

【0002】

【従来の技術】DNAマイクロアレイなどのプローブ担体等を用いて標的物質を含む試料の分析には、プローブ担体と試料とを反応させて検査用プレートを作製し、検査用のプレート中のプローブと標的物質との反応の有無を標識物質からの発光として検知する方式が採用されている場合が多い。このような反応には、担体に分析対象の試料を固定してこれにプローブを反応させる方法や、逆にプローブを担体に固定しておき、これに試料を反応させ方法がある。反応の有無は、プローブと標的物質との結合物（複合物）のみが標識物質を有するように反応系を設定し、反応位置において標識物質からの発光を検知することで、反応が生じたことを検出するのが一般的である。

【0003】このような標識物質としては、蛍光色素が多く利用されており、蛍光色素標識物質からの発光を検知するための装置は、共焦点光学顕微鏡の光学系に、各蛍光色素標識からの蛍光波長に対応した光学フィルタ及びダイクロイックミラーを組合せて使用し、高感度なPMT（フォトマル）に検出すべき蛍光を導くようなメカニズムが用いられている。このような装置では、蛍光を誘発するために光照射するスポットサイズも微小な

め、DNAマイクロアレイ上の一点一点を細かく走査する装置が現在主流である(図1参照)。

【0004】このような装置としては、アジレントテクノロジー社、Axon Instruments Inc. のGenePix 4000 Bなどがある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】平板状のチップとして形成されたDNAマイクロアレイを用いて作製した検査用プレートに読み取り装置の読み取り部を走査させる装置の場合は、一点一点走査するが故に、一つのDNAマイクロアレイ全体を走査し終わるまでに数分の時間を要することや、XYステージ、その駆動系が必須であり、部品点数が多く、高価な装置になりがちである。

【0006】本発明の目的は、DNAマイクロアレイなどを用いて作製した検査プレート上を読み取り装置の読み取り部を走査させる必要がなく、検査プレートの被測定面での反応結果を一度に画像として検出できる装置システム、及びそれに用いる光学系を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明にかかる基体の表面に配置された複数の被測定部からの発光を検出するための装置は、前記被測定部と密着し、前記被測定部からの発光を受光するための受光面を有し、受光した光を前記受光面の他面側に伝送するファイバーフェースプレートと、前記ファイバーフェースプレートの前記他面側において、前記被測定部から伝送されてきた光を受光し検出するための検出手段とを有することを特徴とする光検出装置である。

【0008】被測定部から得られる発光が、蛍光標識物に励起光を照射することで得られるものである場合には、透明基板の表面に対する裏面側または側面側から前記被測定面に入射し、裏面側に反射または側面側に透過する角度で該被測定面に励起光を照射するための光学系を更に有するものとすることができる。

【0009】受光手段としてCCDイメージセンサを用いた場合における読み取り面の画素ピッチは、被測定面内に配列された複数の被測定部の配列ピッチに対応したものであることが好ましい。

【0010】本発明にかかる発光読取装置は、基板の表面に配置された複数の被測定部からの発光を読み取るための装置であって、前記被測定部と密着し、前記被測定部からの発光を受光するための受光面を有し、受光した光を前記受光面の他面側に伝送するファイバーフェースプレートと、前記ファイバーフェースプレートの前記他面側において、前記被測定部から伝送されてきた光を受光し、受光した光の情報を電子データとして出力するためのCCDイメージセンサと、前記CCDイメージセンサから出力された電子データを蓄積するメモリーと、を有することを特徴とする発光読み取り装置である。

【0011】被測定部から得られる発光が、蛍光標識物に励起光を照射することで得られるものである場合には、この読み取り装置は、透明基板の表面に対して裏面側または側面側から被測定面に入射し、裏面側に反射または側面側に透過する角度で被測定面に励起光を照射するための光学系と該光学系に励起光を供給する励起光発生手段とを更に有するものとすることができる。

【0012】また、この発光読取装置は、メモリーに蓄積された光量に関する電子データの呼び出し手段と、この呼び出し手段によって呼び出された電子データに基づいて発光像を表示する表示手段とを更に有するものとすることができる。

【0013】本発明にかかる発光読取装置の読み取り部は、CCDセンサにファイバーフェースプレートを組合わせた構成の光学系を有するもので、簡単な構成で、検査プレートから得られる光学像を二次元画像として一括取り込み可能であり、走査系を排除した簡便な操作による検査プレートからの発光の測定をより短時間で行なうことを可能とする。更に、光学系が単純化されたことで、読み取り装置自体のコストダウンも可能である。

【0014】なお、アレイ状のセンサであるCCDセンサを用いて走査系を単に排除したとしても、例えば通常の手法で結像光学系を構成すれば、CCDセンサの読み取り面への結像のための光学レンズ、それを固定するための機械的な部品であるホルダーなどは最低限必要となる。また、光学レンズを用いるが故の必須問題である収差、特に画像周辺部と中心部のゆがみを認識し、これを補正するためのソフトなどが必要となる。更に、焦点を合致させるために最低限Z方向のアライメントが必要となり部品点数が多い。また、蛍光色素標識を用いた場合などには、通常の撮像における場合に比べて光量が少なく収差の測定感度への影響が大きくなる場合がある。

【0015】このように、従来の光学系とCCDイメージセンサを組合わせたCCDカメラシステムは、測定感度やコストダウンの点において十分に満足できないという問題を有している。

【0016】これに対して、本発明において用いられる光学系は、CCDイメージセンサとファイバーフェースプレートとの組合せという部品点数の少ない簡単な構成を有し、光学レンズ系を用いる場合のような収差がなく、更に、ファイバーフェースプレートの接像面を検査プレートの被測定面に密着させて読み取り操作を行なうので、光学レンズ系を用いる場合におけるような焦点調整のためのZ方向のアライメントも省略できる。

【0017】

【発明の実施の形態】図2～図4に本発明の各実施の形態を示す。

【0018】図2の(a)は、CCDセンサの画素12の上に、シアン、イエロー、グリーン、マゼンタの補色フィルタが施された、一般的なCCDセンサの構造を示

している。このような構成のCCDセンサを読み取り光学系の構成要素として用いることができる。更に、補色フィルタの上部に更にマイクロレンズアレイを設けたものを用いることもできる。このフィルタは3原色フィルタでも構わないが、感度の点からは補色フィルタを用いた構成が好ましい。なお、フィルタはスポットからの発光の種類によって適宜選択できる。図2に示した例では、DNAマイクロアレイ14のプローブDNAのドット状のスポット13の配列ピッチがCCDセンサの画素の配列ピッチに対応していることである。図2(b)の場合は、よりシンプルなモノクロのCCDセンサを示したもので、DNAのスポット13の配列ピッチが、CCDセンサの画素と1:1に対応し、より高密度に配列されたプローブDNAのスポットに対応できるものである。より一般的には、DNAのドットを包囲するに十分な大きさの $m \times n$ 画素がDNAのスポット13の配列ピッチに対応していれば良い。複数の蛍光がスポットから検出されるような場合に対して、図4に示すような薄いカバースリップタイプの測定すべき蛍光波長を通過させるフィルタ16を逐次挿入することで対応できる。

【0019】プローブと標的物質の含有の有無を検査する試料との反応を行なって得られた検査プレートのスポットの配列を有する被測定面に、ファイバーフェースプレートの接像面を密着させてこれを覆い、光学像の読み取り操作を行なう。本明細書において、ファイバーフェースプレートは、ファイバーオプティクスとも呼ばれるものであり、互いに平行に配列した多数のガラスなどの光学ファイバーからなる板状の光学素子で、一方の面で受像した像を他方の面に転送する機能を有し、レンズのような収差を生じさせることがないものをいう。ファイバーフェースプレートとしては、像を等倍転送できるもの、もしくは像倍率を変えて転送できるもの、いずれでもよく、また高解像度であるほうが望ましい。

【0020】光学像の読み取り効率を高めるためには、光学的な影響が実質的にない封入剤15を被測定面とファイバーフェースプレートの接像面との間に滴下充填してこれらを気相の介在がない状態で液絡する。蛍光を測定する場合には、一般的に使用されている無蛍光のグリセロール希釈液を用いることができる。このように検査プレートの被測定面とファイバーフェースプレートの接像面とを液絡することで、CCDセンサの画素の素子22にスポットからの光量をなるべく無駄にしないように導くことが出来る。ファイバーフェースプレートに入力した光は、CCDセンサの読み取り面に伝達される。すなわち、被測定面内の発光スポットからなる発光像は二次元の像としてCCDセンサに一度に読み取られる。このような観点から、ファイバーフェースプレート19を透過した光がCCDセンサの読み取り面に効率よく伝達されるためには、CCDセンサの読み取り面とファイバーフェースプレートの面とを光学接着剤で充填接合した

構成としたり、これらの面の間にギャップを設ける場合でもこのギャップを最小限とすることが好ましい。

【0021】図5は、蛍光を測定する場合における本発明にかかる読み取り装置の主要な構成部分を示すものである。検査プレートは、封入剤15で液絡が保たれた後、励起光が直接CCDに入射しない程度の低い角度で、裏面側もしくは側面側からビーム18が、被測定面で裏側に反射もしくは側面に透過するような条件で照射される。このビーム18は、蛍光色素の励起に必要な波長を含むもので、公知の励起光発生手段から光学系を介して照射される。このビームとしてはレーザービームなどが利用できる。

【0022】ここで、被測定面における反射は一般的に言われるところの全反射条件にほぼ等しいもので、その際エバネッセントと呼ばれる光が一部その界面に進入しており、蛍光の励起に関与する。全反射する場合の条件は、臨界角を θ_c として、 $\theta_c = \arcsin(N_2/N_1)$ で表されることが知られている。また、このときのエバネッセント波の進入深さ dp はビーム18の入射角 θ_i として、 $dp = (\lambda/N_1) / [2\pi \{ \sin^2 \theta_i - (N_2/N_1)^2 \}^{1/2}]$ 程度と見積もられている(J. Immunol. Method., 74: 253-265 (1984))。この関係式より、適当とされる封入剤の屈折率、検査プレートに用いる透明基板の屈折率(無蛍光)などから入射角 θ_i を決定することができ、更に、スポットの厚みと進入深さ dp が十分な関係にあるかどうかを確かめることができる。

【0023】図6に本発明にかかる読み取り装置の他の実施の形態を示す。図6では、He-Neレーザーラインモジュール30(これはレーザーをライン状のビームとしに整形するユニットを内蔵している)から出た光は、スリットを通り、ミラー32、33で曲げられて検査プレートホルダー34に収められた検査プレートの被測定面に、被測定面に対する裏面側から照射される。ミラー34と検査プレートホルダー34は、CCDセンサの各画素に対応するため微調整機構を有する。主要部分である冷却機能を持ったCCDカメラユニット17はLアングルのバーを倒すことによって、検査プレートの被測定面を覆う位置に重ね合わせることができるようになっている。CCDカメラユニットは、そこに蓄積された光量データを必要に応じて設けられたコンピュータ29にインターフェース35を介して送られる。インターフェース35は、コンピュータ側に市販のビデオボードを挿入させる場合には、NTSC等のビデオ端子を用いたものとなるが、市販のデジタルカメラのようにCCDカメラユニット25内部にフレームメモリを有する場合には、デジタルカメラと同様、DIV端子、USB端子でも構わない。

【0024】コンピュータ側に取り込まれた画像データは、市販の画像処理ソフトで画面上に表示したり、DNAのドット領域ごとに、物質ごとの定量値に関係するところの、輝度に相当する電子データの総和を求めたりする

ことができる。本発明では予めDNAのドット配列ピッチにCCDの画素 $m \times n$ 領域が対応づけられているので、特別に開発された画像処理ソフトで複雑な処理をする必要が無く、容易にこのことが行える。また、レーザ光源についても、複数の蛍光物質の励起光源とするためには、倍波YAGレーザなど、複数のレーザソースをミラーで集め、ライン状ビームに整形してから検査プレートの被測定面に照射するようにしても良い。

【0025】また本発明は上述のレーザ励起光源とその光学系を用いず、蛍光標識物の代わりにラジオアイソトープ標識物の放射線を励起光源として用い、液体シンチレータによって、蛍光発光に変換しても、なんら問題ない。

【0026】本発明における読み取り装置によって検査される検査プレートは、プローブのスポットを透明基板上に配列固定したプローブ担体に、標的物質の含有の有無が試験される試料を反応させて得たものや、標的物質の有無が試験される試料のスポットを透明基板上に配列固定した試料固定化担体に、プローブを反応させて得たもので、プローブと標的物質との反応の有無を発光の有無として検出できるものである。

【0027】プローブは、特定のターゲット（標的）によって認識され得るもので、しばしばリガンドと呼ばれるものである。更に、このプローブには、特定の標的によって認識され得るオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチド、ペプチド、あるいはその他のポリマーなどが含まれる。用語「プローブ」は、個々のポリヌクレオチド分子などのプローブ機能を有するプローブ分子そのものを意味する場合と、分散した状態等で担体表面に固定されたポリヌクレオチド等、プローブ機能を有するプローブ分子の集団を意味する場合がある。また、プローブは、リガンド-抗リガンド対の一部として標的と結合し得るか、または結合するようになり得るものである。本発明におけるプローブ及び標的は、天然において見出されるような塩基、またはそのアナログを含み得る。

【0028】更に、担体上に供給されるプローブの一例としては、標的核酸とハイブリダイゼーション可能な塩基配列よりなるオリゴヌクレオチドの一部に、リンカーを介してまたは直接蛍光色素と、担体との結合部とを有するものを挙げることができる。なお、このような構成の場合における蛍光色素と担体との結合部のオリゴヌクレオチドの分子内での位置は、所望とするハイブリダイゼーション反応を損なわない範囲内において特に限定されない。

【0029】なお、本発明の方法により製造されるプローブ・アレイに採用されるプローブは、その使用目的に応じて、適宜選択されるものであるが、本発明の方法を好適に実施する上では、プローブとしては、DNA、RNA、cDNA、PNA、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、その他の核酸、オリゴペプチド、ポリペプ

チド、タンパク質、酵素、酵素に対する基質、抗体、抗体に対するエпитープ（抗原）、ホルモン、ホルモンレセプター、リガンド、リガンドレセプター、オリゴ糖、ポリ糖のいずれかであることが好ましく、必要に応じてこれらの2種以上を組合せて用いることができる。

【0030】一方、本発明の方法では、プローブは担体表面に結合可能な構造を有しており、最も基本的な物理的吸着による固定法は言うに及ばず担体上へのプローブの固定がこの結合可能な構造を介して行われていることが望ましい。その際、プローブが有する担体表面に結合可能な構造は、アミノ基、スルフィドリル基、カルボキシル基、水酸基、酸ハライド化物（ハロホルミル基； $-COX$ ）、ハライド化物（ $-X$ ）、アジリジン、マレイミド基、スクシイミド、イソチオシアネート、スルフォニルクロリド（ $-SO_2Cl$ ）、アルデヒド（ホルミル基； $-CHO$ ）、ヒドラジン、ヨウ化アセトアミドなどの有機官能基を導入する処理により形成されたものであることが好ましい。

【0031】本発明にかかるプローブ・アレイの製造方法は、プローブ・アレイの製造に際し、予め別途に作製した複数種のプローブを溶液とし、担体上の各ウエルに、液体吐出装置を用いて吐出させて供給することで、プローブ・アレイにおける多種高密度化を達成するものである。

【0032】プローブを担体に固定化したプローブ担体は、例えば、特開平11-187900号公報に記載された方法などを用いて製造することができる。

【0033】

【発明の効果】本発明によれば、簡便な構成で製造コストの低い検査プレートからの発光像の読み取り装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】従来の読み取り装置の構成を示す図である。

【図2】(a)及び(b)は検査プレートにおけるスポットの配置とCCDセンサの画素の配置との関係を示す図である。

【図3】読取装置における液絡の作成過程を示す図である。

【図4】読み取り装置外部にフィルタを追加的に用いる例を示す図である。

【図5】本発明にかかる読み取り装置の一例を示す図である。

【図6】本発明にかかる読み取り装置の他の例を示す図である。

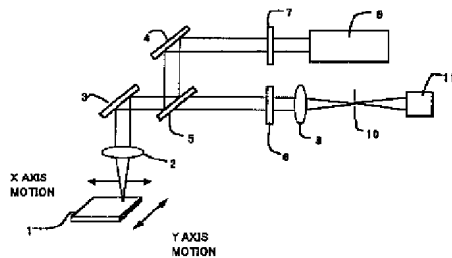
【符号の説明】

- 1 検査プレート
- 2 対物レンズ
- 3 ミラー
- 4 ミラー
- 5 ビームスプリッタ

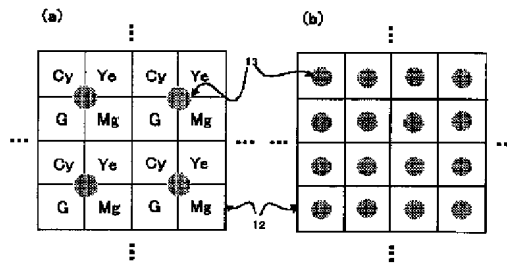
- 6 蛍光フィルタ
- 7 励起フィルタ
- 8 ディテクターレンズ
- 9 レーザソース
- 10 ピンホール
- 11 検出器 (PMT)
- 12 CCD画素
- 13 検査プレート
- 14 ガラス基板
- 15 封入剤
- 16 フィルタ

- 17 CCDカメラユニット
- 18 レーザビーム
- 19 ファイバーフェースプレート
- 20 マイクロレンズアレイ
- 21 無色フィルタ
- 22 CCD素子
- 23 CCDパッケージ
- 24 プリント基板
- 25 冷却ユニット
- 26 信号ケーブル

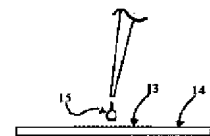
【図1】



【図2】



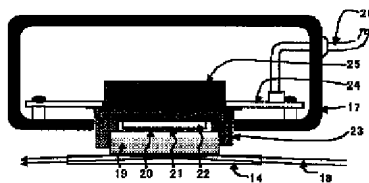
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

